

## 組織培養インフルエンザワクチンの力価測定に必要な標準品に関する研究

分担研究者 板村 繁之 国立感染症研究所 主任研究官  
協力研究者 河野 直子 国立感染症研究所

**研究要旨** わが国での組織培養インフルエンザワクチンの実用化の促進を目指し、組織培養ワクチンの効果・安全性のための品質確保を目的として本年度は、昨年度に引き続きワクチンの力価測定に必要な標準品に関する基礎的な研究を実施した。組織培養ワクチンの力価は一元放射免疫拡散試験法(SRD法)によって測定するが、そのためには標準抗原が必要で測定値の精度にはその品質が重要である。本研究ではSRD試験に使用する標準抗原のHA含量の値付けについて検討した。値付けの変動を少なくするには一次標準抗原のHA含量の設定が重要であることがわかった。一次標準抗原のHA含量を決めるための試験、特にHA蛋白の割合を求めるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)法の標準化が重要な課題である。

### A. 研究目的

インフルエンザワクチンは1980年代後半から1990年代にかけて著しく生産量が低下した時期もあったが、ワクチンの接種対象者を学童中心から実際に健康被害を受ける、いわゆるハイリスク者である65歳以上の高齢者へとワクチンの接種方針を変更したことや、さらに1997年に香港で高病原性鳥インフルエンザA/H5N1ウイルスによるヒトへの感染が確認され、現在に至る新型インフルエンザの出現が危惧されるような状況もあり、ワクチン接種への意欲が高まったために1990年代後半より徐々にワクチン生産も回復し2006年には約2,518万本に達している。そのため、インフルエンザワクチンの安全性の確保と安定供給は重要な課題である。

現行のインフルエンザワクチンは発育鶏卵を使用して製造される不活化ワクチンである。長期間にわたって製造され実績のあるワクチンではあるが、発育鶏卵を使用したワクチン製造にはいくつかの問題点が存在する。発育鶏卵の安定供給の確保のためには一定の鶏や施設・設備を必要とするため緊急に製造量の増減に対応するのは容易ではない。一方、細胞培養ワクチンでは製造量の変化に比較的容易に対応することが可能と考えられる。新型インフルエンザ出現のような緊急事態に備えた迅速な製造体制の整備の観点からも細胞培養ワクチンに期待される点も多い。実際に、ワクチン製造所に発育鶏卵を供給している養鶏場もしくはその近郊で高病原性鳥インフルエンザが発生した場合、鶏卵の移動が不可能となり発育鶏卵に依存したワクチン製造ではワクチン

の製造に支障をきたすことが考えられる。また、発育鶏卵では培養細胞などと比較すると外来性の病原体等の迷入の可能性も高く、その頻度についても予測できない。このような特長から組織培養ワクチンの開発、実用化はワクチンの安全性の確保、安定供給や新型インフルエンザ対策の観点から極めて重要な課題である。わが国でもこのような観点から組織培養ワクチンの研究開発が進められてきた。一方、海外においては培養細胞を使用したインフルエンザワクチンの開発は実用化直前の状況である。

そこで本研究ではわが国での組織培養インフルエンザワクチンの実用化を促進するために、組織培養ワクチンの効果・安全性のための品質確保を目的として研究を実施することとし、本年度は、昨年度に引き続き組織培養ワクチンの力価測定に必要な標準品に関する基礎的な研究を実施した。

### B. 研究方法

組織培養ワクチンの力価を測定するのに必要な一元放射免疫拡散試験法(SRD法)に使用する標準抗原のHA含量の値付けについて検討を実施した。一次標準抗原はインフルエンザウイルスA/Hiroshima/52/2005(IVR-142)(H3N2)株について発育鶏卵で増殖、ウイルス粒子を精製して作製した。標準抗原についてはウイルスを精製後、不活化、凍結乾燥して作製した。標準抗原のHA含量の値付けの方法は、まず一次標準抗原をローリー法により測定して蛋白含量を求め、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)法によって得

られたウイルス蛋白全体に占める HA 蛋白の割合を乗じて一次標準抗原の HA 含量を決定した。次に値付けを行う凍結乾燥した標準抗原を、既知の HA 含量を有する一次標準抗原を用いて SRD 法によって HA 含量を決定した。これらの測定を 3ヶ所の異なる実験室で行いその測定値について比較した。

### C. 研究結果

一次標準抗原の 1 ロットについて 2ヶ所の異なる実験室での成績を比較すると、蛋白含量については比較的良く一致した値が得られたが、PAGE 法による HA 蛋白の割合について 20%の違いが認められた (表 1)。次に異なる 2 ロットの一次標準抗原を使用して標準抗原 2 ロットについてそれぞれ HA 含量を SRD 法によって 3ヶ所の実験室で独立に測定を実施した (表 2)。その結果、同一実験室であっても異なる一次標準抗原を使用した場合、約 1.8 倍の測定値の違いが認められた。この差異は SRD 試験に使用した異なる 2つの抗血清のロットにはほとんど影響を受けていなかった。実験室間の測定値については一次標準抗原ロット C を使用したものについての成績しか得られていないが、測定値については大きな差異は認められなかった。

### D. 考察

標準抗原の値付けについて実験室間での測定変動について検討を実施した。その結果一次標準抗原の HA 含量を決定する際には PAGE 法による HA

蛋白の割合の測定値が大きな変動を示した。一次標準抗原の HA 含量を一定にするためには PAGE 法の標準化が重要であることがわかった。一方、標準抗原の HA 含量を一次標準抗原を使用して SRD 法で測定する際には、使用する一次標準抗原による違いが大きな変動因になることが示唆された。この使用する一次標準抗原の違いが標準抗原の値付けに与える影響は、HA 蛋白の割合の測定値の変動によるものか、ウイルス抗原の抗原性変異による SRD 試験への影響によるものかは本研究では明確ではなく、今後の研究が必要である。

### E. 結論

組織培養ワクチンの力価を測定するのに必要な SRD 試験に使用する標準抗原の HA 含量の値付けについて検討し、値付けの変動を少なくするには一次標準抗原の HA 含量の設定が重要であることがわかった。一次標準抗原の HA 含量を決めるための試験、特に HA 蛋白の割合を求める PAGE 法の標準化が重要な課題である。

### F. 研究発表

なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他            特記事項なし

表1 SRD試験用一次標準抗原のHA含量測定値の実験室間差

測定実施実験室	一次標準抗原 (PLS)		
	蛋白含量 (ug/ml)	% HA by PAGE	HA含量 (ugHA/ml)
B	1,023	35	358
C	1,112	55	612

表2 SRD試験用標準抗原のHA含量設定値の実験室間差

標準抗原 ロット番号	実験室	HA含量(ug/vial)			
		PLS		C	
		A	C	A	C
2006AH3A	A	107	106	59	60
	B	-	-	-	51
	C	-	-	-	74
2006AH3B	A	144	108	80	61
	B	-	-	-	64
	C	-	-	-	72

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)  
H19年度分担研究報告書

組織培養インフルエンザワクチンの試作及び免疫原性試験における鶏卵ワクチンとの比較検討(2)

分担研究者 細井和男 デンカ生研株式会社ワクチン研究部部長

### 研究要旨

- (1) 組織培養法によって産出したインフルエンザウイルス培養液から試作したサブユニットワクチンと、従来の鶏卵スプリットワクチンとの有効性比較を試みた。
  - (2) A/New Caledonia/20/99(H1N1)株をモデルウイルスとして、組織培養法にて得たウイルス培養液から、不活化精製ウイルス粒子を調製し、これを界面活性剤処理等により、製法の異なる2種類の組織培養サブユニットワクチンを試作した。
- 有効性評価のため本ワクチンを、対照となる鶏卵スプリットワクチンと共にマウス免疫原性試験に供し、得られたマウスの抗血清を用いて中和抗体価を測定した結果、両者で中和抗体価に大きな差異はなく、組織培養サブユニットワクチンは鶏卵スプリットワクチンと同程度の有効性を有することが示唆された。

### A. 研究目的

発育鶏卵を用いたインフルエンザワクチンの製造に対して、インフルエンザワクチンの安定供給や、近年懸念されているH5N1高病原性トリインフルエンザウイルスの現状から、動物細胞を用いた組織培養インフルエンザワクチンの開発が期待されている。

これまでの研究では、組織培養法で産出・精製したインフルエンザウイルス試料と従来の鶏卵法でのウイルス試料を用いたSRD試験によるHA含有率の比較から、両者ほぼ同等の比活性を有することが確認された。さらに、組織培養法によって産出したウイルス培養液を精製・不活化後、エーテル処理により試作したスプリットワクチンの有効性評価を行い、対照の鶏卵スプリットワクチンと同程度の有効性を有することが示唆された。

本年度の研究では、スプリットワクチンと同じ出発材料である不活化精製ウイルス粒子から、ウイルス表面抗原を主成分とするサブユニットワクチンを試作し、本ワクチンと鶏卵スプリットワクチンとの有効性比較を試みることにする。

### B. 研究方法

- 1) インフルエンザウイルス A/New Caledonia/20/99(H1N1)株をMDCK細胞で培

養し、その培養上清を限外ろ過濃縮、シヨ糖密度勾配遠心等により精製・不活化し、不活化精製ウイルス粒子を作製した。

- 2) 不活化精製ウイルス粒子を界面活性剤処理等により、製法の異なる2種類の組織培養サブユニットワクチンを試作し、SRD試験によるHA含有率を確認した。
- 3) 組織培養サブユニットワクチンは鶏卵スプリットワクチンと共に、下記条件でマウス免疫原性試験に供した。  
動物: ddY マウス 雌 4週齢  
投与量: 0.04, 0.008, 0.0016  $\mu$ gHA/匹(一群10匹)  
免疫期間: 初回免疫から3週目に追加免疫、5週目に全採血を実施
- 4) 得られた抗血清について、MDCK細胞を用いた中和抗体価を測定した(攻撃ウイルスとして鶏卵にて産出したウイルスを使用した)。
- 5) 組織培養サブユニットワクチン、鶏卵スプリットワクチンの投与量と中和抗体価の関係をグラフ化し、ドーズレスポンスの比較を行った。

### C. 研究結果と考察

試作した2種類の組織培養サブユニットワクチン(以下、TCIV-SU1、-SU2)と鶏卵スプリットワクチン

(以下、EGG-SP)について、たん白質濃度及びSRD 法による HA 含量の分析結果を以下に示す。

サンプル名	EGG-SP	TCIV-SU1	TCIV-SU2
たん白質濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	1031	618	268
SRD 法 HA 含量 ( $\mu\text{g HA/mL}$ )	392	592	271
HA 含有率 ( $\mu\text{g HA}/\mu\text{g P}$ )	0.38	0.96	1.01

TCIV-SU1 及び TCIV-SU2 の SRD 試験による HA 含量はたん白質濃度とほぼ同じ値を示したことから、両 TCIV-SU は EGG-SP と異なり HA が大部分を占めるサブユニットワクチンであることが確認された。

これら試作ワクチンをマウス免疫原性試験に供し、投与量と抗体価の関係をグラフ化したところ、全体的にドーズレスポンスは良好であった。0.04 及び 0.008  $\mu\text{g HA/匹}$  における TCIV-SU1, -SU2 及び EGG-SP での中和抗体価 (対数平均値:  $\log_2(\text{抗体価}/5)$  と 95% 信頼限界) を図 1 に示した。

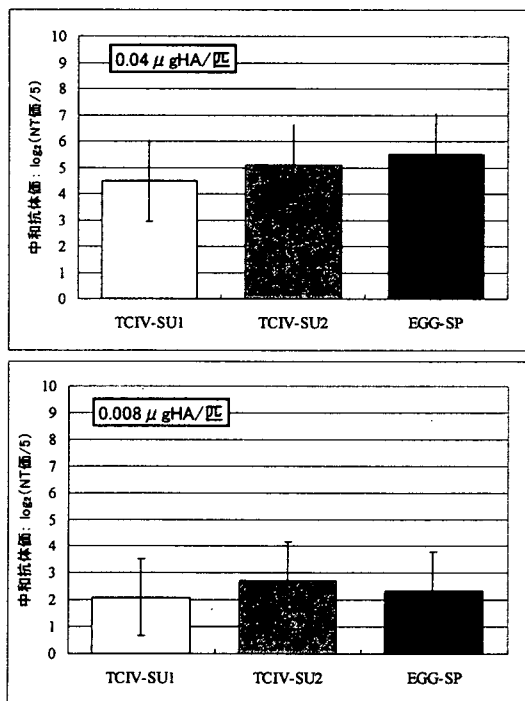


図 1 中和抗体価の比較

今回試作した TCIV-SU1 及び -SU2 は免疫原性を有し、EGG-SP と同程度の有効性を有することが確認された。また、サブユニット化の方法によって有効性に影響がある可能性もあるため、精製方法を含めて今後更なる検討が必要である。

#### D. 結論

A/New Caledonia/20/99(H1N1)株をモデルウイルスとして、組織培養法で産出・調製したサブユニットワクチンと、従来の鶏卵スプリットワクチンとの有効性比較を試みた。

試作した 2 種類のサブユニットワクチンは、たん白質濃度及び SRD 法による HA 含量測定の結果から、HA が大部分を占めるワクチンであることを確認した。

本ワクチンを鶏卵スプリットワクチンと共にマウス免疫原性試験に供し、得られた抗血清を用いて中和抗体価を測定した。組織培養サブユニットワクチンは鶏卵スプリットワクチンと同程度の中和抗体価を示し、鶏卵スプリットワクチンと同程度の有効性を有することが示唆された。

#### E. 研究発表

1. 研究発表 なし
2. 学会発表 なし

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他特記事項 なし